



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 5/06, 5/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/11963 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Mai 1995 (04.05.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03501 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1994 (25.10.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 36 399.7 26. Oktober 1993 (26.10.93) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BADER, Augustinus [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, D-31274 Lehrte (DE). (74) Anwalt: LORENZ, Werner; Fasanenstrasse 7, D-89522 Heidenheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: METHOD FOR CULTURING BIPOLAR-ADHESION HEPATOCYTES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ZÜCHTEN VON BIPOLAR ADHÄRIERTEN HEPATOZYTEN (57) Abstract <p>A method of adding extracellular matrix components to the stationary phase of the matrix for bipolar adhesion of hepatocytes enables these substances to be concentrated and bonded to a defined base matrix composed of a simple base matrix (e.g. type I collagen). One advantage, for example when fibronectin is added, is to provide a completely serum-free culture of liver cells while maintaining normal morphology and function; as a result conventional culture media previously unsuited to serum-free culture of liver cells are now also suitable for relatively long-term serum-free culture. Furthermore, reproducibility of trial results and mechanical stability are substantially improved over the conventional form of matrix layering. The method is applied using a specially adapted kit. Other matrix components can also be added to the matrix by this method, and thus concentration and bonding can be effected within the fibrillary matrix skeleton after the base matrix has gelled.</p> (57) Zusammenfassung <p>Bei einem Verfahren der Zugabe von extrazellulären Matrixkomponenten zur stationären Phase der für bipolare Adhäsion von Hepatozyten vorgesehenen Matrix wird eine Anreicherung und Bindung dieser Substanzen an eine definierte Grundmatrix bestehend aus einer einfachen Grundmatrix (z.B. Kollagen Typ I) erreicht. Ein Vorteil ist z.B. im Falle der Zugabe von Fibronektin die Ermöglichung der völlig serumfreien Kultur von Leberzellen unter Erhalt normaler Morphologie und Funktion, sodaß auch konventionelle, bisher nicht zur serumfreien Kultur von Leberzellen geeignete Kulturmedien für die längerfristige serumfreie Kultur geeignet sind. Weiterhin ist die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse und die mechanische Stabilität gegenüber der konventionellen Form der Matrixüberschichtung wesentlich erhöht. Die Anwendung dieses Verfahrens findet Ausdruck in einem dafür adaptierten Kit. Entsprechend diesem Verfahren können auch andere Matrixkomponenten der Matrix hinzugegeben werden und dadurch eine Anreicherung und Bindung innerhalb des nach Gelierung der Grundmatrix fibrillären Matrixgerüsts erreicht werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

-1-

Verfahren zum Züchten von bipolar adhärenierten Hepatozyten

=====

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Matrixbedingungen bipolar adhärenierter Hepatozyten und zur Herstellung eines entsprechend konfigurierten Zellkulturkits.

Die Verwendung von primär komplexen Matrixsubstanzen, wie sie von Sarcomen abgeleitet werden (Matrigel), ist für die Kultur von Hepatozyten nachteilig und für Untersuchungen die die in vivo Situation repräsentieren sollen, nicht sinnvoll, da sie zu qualitativen Veränderung dieser Zellen führen wie z.B. der Morphologie oder der Cytochromexpression.

Weiterhin können in einem derartigen System nur unzureichend molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, da durch die Gewinnung der Matrixkomponenten aus einem Sarkom ein nicht unerheblicher Anteil von kontaminierender DNA und RNA spaltenden Enzymen (RNAsen) notgedrungen in das Kulturmodell miteingebracht wird.

Wurden derartige primär komplexe Matrixen nicht verwendet, so wurden diese Matrixkomponenten bisher dem Kulturüberstand von nach der Einzelgeltechnik kultivierten Hepatozyten zugegeben, oder auch innerhalb der Matrix von Einzelgelsystemen verwendet. Trotz dieser Bemühungen ließen sich keine dem Potential der Hepatozyten entsprechenden Effekte erreichen, da die hierbei verwendete Hepatozytenkulturtechnik nicht den Anforderungen der Hepatozyten an ein in vitro System entsprach. Hepatozyten benötigen in vitro eine bipolare Adhäsion an extrazelluläre Matrix, wodurch die in vivo Situation innerhalb des Dissektions Spaltraums imitiert werden kann. Derartige Bestre-

-2-

bungen fanden Niederschlag in der sogenannten Sandwich-technik oder auch modifizierte Gel Entrapment Technik. Das Gemeinsame dieser beiden Techniken liegt darin, daß die Hepatozyten in einem Monolayer eingebettet werden, umgeben von zwei Schichten. Diese Einbettung wurde bisher mit einer einfachen Grundmatrix, basierend auf Kollagen Typ I aus Rattenschwanzkollagen, hergestellt. Diese Techniken sind aber immer noch defizitär hinsichtlich des eigentlichen Ziels, der möglichst in vivo artigen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.

Ein Verfahren dieser Art ist z.B. in der DE 42 06 585 beschrieben.

Dies bedingt eine Reihe von wesentlichen Nachteilen wie z.B. die Unmöglichkeit diese Zellen ohne Zugabe zusätzlicher externer Faktoren mittels des Kulturmediums innerhalb derartiger Substrate serumfrei kultivieren zu können. So müssen zusätzlich durch das Kulturmedium mittels FCS oder speziell adaptierten Kulturmedien fehlende Faktoren hinzugegeben werden. Weiterhin fehlen in diesen einfachen Grundmatrixen Adhäsionssubstrate wie sie in vivo jedoch eine bedeutende Rolle spielen. Funktionelle Veränderungen der Hepatozyten können dadurch induziert werden.

Die serumfreie Kultur von Hepatozyten wurde bisher durch Verwendung spezieller Kulturmedien erreicht, die als Überstand zu bereits adhärenenten oder sich im Adhäsionsprozess befindlichen Zellen hinzugegeben wurden. Diese speziell entwickelten Kulturmedien enthalten zum Teil sehr teure Zusätze deren Konzentrationen notgedrungen durch das Volumen des Kulturmediums verdünnt werden und die auch wegen des in regelmäßigen Abständen erforderlichen Wechsels von Kulturmedium immer wieder erneut hinzu-

-3-

gegeben werden. So ist z.B. bei primären Hepatozyten der Medienwechsel alle 24 h bis 48 h erforderlich. Diese Kulturemedien werden aus historischen Gründen weiterhin in unnötiger Weise und Unkenntnis Faktoren zugestetzt wie sie für eine längerfristigen serumfreie Kultur nicht benötigt werden. Hierzu zählt z.B. Transferrin, Hormone, Hypophysenextrakte und andere.

Ein universelles Verfahren, bei dem relevante Matrixkomponenten zu den bipolar adhärenzierten Hepatozyten im unmittelbaren Adhäsionsbereich gebracht werden könnten, würde die Kultur erleichtern und vorteilhaftere Bedingungen in der Mikroumgebung der Zellen schaffen.

Ein Vorteil eines derartigen universellen Verfahrens wäre die Einsparung von Kosten und Ressourcen. Diese Sandwichtechniken alleine reichen zur serumfreien Kultur dieser Zellen jedoch nicht aus. Bisher war noch kein Verfahren bekannt, das in direktem Bezug für die Herstellung der Sandwichtechnik (Sandwichttechnik) oder Gel Entrapment Technik (Gel Entrapment Technik) die serumfreie Kultur von Hepatozyten ermöglicht, ohne hierbei auf die Kombination von speziell adaptierten Medien angewiesen zu sein. Diese sind im kommerziellen Sektor auch als zur serumfreien Kultur geeignete Medien bezeichnet. Weiterhin gibt es bisher keinen Zellkulturkit, der die Sandwichtechnik für primäre Hepatozyten an sich ermöglicht.

Als Grundmatrix der Sandwichtechnik oder Gel Entrapment Technik dient üblicherweise Kollagen Typ I, das z.B. aus Rattenschwänzen oder Rinderhaut in herkömmlicher Weise präpariert werden kann. Am Ende des Herstellungsprozesses wird der pH dieser Kollagenlösung auf ca. 4 eingestellt und in dieser Form bei 4 °C aufbewahrt. Auch die Herstellung eines Kollagen Lyophilisats in herkömmlicher Weise

-4-

ist möglich. Bei der Sandwichtechnik bzw. Gel Entrapment Technik wird die saure Matrix mit einem basischen Mediumkonzentrat (üblicherweise ein 10x Konzentrat) im Verhältnis 1:10 gemischt. Dieses Mediumkonzentrat dient als Katalysator zur Induktion der Gelierung der Matrix und wird im Gelierungsprozess in die Grundmatrix gebunden. Wird nach der Sandwichtechnik weiter vorgegangen, so wird diese Mixtur auf die zur Kultur vorgesehenen Flächen aufgegeben. Nach der Gelierung werden die Zellen aufgetragen und nach deren Adhäsion wird der Überstand, der auch die nicht adhärenen, toten Zellen enthält, entfernt und die zweite Matrixschicht daraufgegeben. Nach erfolgter Gelierung dieser zweiten Schicht wird nun das Kulturmedium (normalerweise 2-4 ml, 28 cm²) auf die verfestigte, obere Matrixschicht aufgegeben. Dieses Kulturmedium wird in regelmäßigen Abständen gewechselt, um einerseits entsprechende Messungen im Überstand vornehmen zu können, und weil andererseits eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten im Überstand stattfindet. Bei der Gel Entrapment Technik werden die Zellen sofort in die kalte, noch flüssige Matrix eingegeben und in diesem Zustand auf die zur Kultivierung vorgesehenen Oberflächen aufgegossen. Nach der Verfestigung dieser Zell-Matrix Schicht wird, wie auch bei der Sandwichtechnik, Kulturmedium oben aufgegeben. Das anfangs beschriebene Mediumkonzentrat ist in der festen (stationären) Phase primär gebunden und ist somit nicht zu verwechseln mit dem als flüssige Phase hinzugegebenen Kulturmedium. Dieses ist durch Abpipettieren einfach und schnell austauschbar.

Sowohl die Sandwichtechnik als auch die Gel Entrapment Technik (Immobilisationstechnik) stabilisieren die Funktion von Hepatozyten in Kultur. Eigene, unveröffentlichte Vorarbeiten haben gezeigt, daß selbst bei Verwendung von Standard Kulturmedien wie z.B. Williams E, die primär

-5-

nicht für serumfreie Kulturen konzipiert wurden, die serumfreie Kultur auch für Hepatozyten in der Sandwichtechnik oder Gel Entrapment Technik möglich ist, wenn Serum zumindest während der Adhäsionsphase dieser Zellen an extrazelluläre Matrix für einige Stunden dem Kulturmedium (Überstand) beigesetzt wird. Dies stellt jedoch eine konventionelle Technik dar, FCS wird in herkömmlicher Weise dem Medium zugesetzt. Ohne die Verwendung von FCS und bei Standardmedien wie z.B. Williams E oder DMEM verlieren diese Zellen trotz allem rasche Ihre Funktion.

In Abhängigkeit von der Serum Charge, die üblicherweise von mehreren Tieren gepoolt wird, können jedoch negative Einflüsse hinsichtlich der Überlebenszeit und der Funktionsfähigkeit in Kultur auftreten. Dies ist abhängig von z.B. Endotoxingehalt und anderen nicht näher identifizierbaren Zusätzen im Serum, das üblicherweise von Kälbern gewonnen wird, die Verwendung von Serum einer anderen Spezies ist jedoch auch möglich. Die mangelnde Definierbarkeit bedingt eine mangelnde Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen. So kann unter Verwendung von FCS zwar eine längerfristige Kultur nach der Sandwichtechnik erreicht werden, die Untersuchungen sind jedoch nach eigenen Daten insbesondere bei rezeptorvermittelten Studien stark chargenabhängig. Dies führte bei Untersuchungen zur Wachstumstimulation der Sandwichtechnik unter Verwendung eines rekombinanten epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) zu einem Mißerfolg der Studien von ca. 50-60 % innerhalb eines Zeitraums von 2 Jahren.

In bisherigen Publikationen über die Sandwichtechnik wird nicht auf derartige Probleme eingegangen und nur endogene Prozesse des Hepatozyten, wie z.B. die Albuminsekretion dargestellt. Bei Zusatz von FCS steigt die Albuminsekretion nach einer initial niedrigen Rate (bedingt durch den

postisolatorischen Traumatisationszustand der durch die Zellisolation verursacht wird) zu dem für die Sandwichtechnik stabilen Plateau an. Bei Weglassen des FCS und Verwendung einer Sandwichtechnik unterscheiden sich die Sekretionsraten nicht innerhalb der ersten Tage in Kultur. Dies bedeutet, daß für eine kurzfristige Kultur matrixüberschichteter Hepatozyten ein Zusatz von Fibronectin nicht nötig ist, und dadurch kein erkennbarer Vorteil hinsichtlich der Albuminsekretionsrate zu erzielen ist.

Auch nicht überschichtete Hepatozyten (konventionelle Kulturtechnik) können serumfrei mit oder ohne FCS und ohne FCS aber mit Fibronectin kultiviert werden. Die zuletzt genannten drei Varianten eignen sich aber in jedem Fall nur für eine kurzfristige Kultur, da das Fehlen einer Kollagenüberschichtung einen Zusammenbruch (bzw. Veränderung) des Zytoskeletts des Hepatozyten und damit der Morphologie dieser Zellen bedeutet. Durch die enge Verbindung von Morphologie und Funktion von Hepatozyten in Kultur ist ein derartiges Kultursystem von nur geringem kurzfristigem und keinerlei längerfristigem Nutzen.

Ein weiteres Problem der extrazellulären Matrix für bipolar adhärierte Hepatozyten 1 ist die geringe Stabilität gegenüber Scherkräften. Selbst unter statischen Kulturbedingungen kann sich insbesondere die bedeckende, obere Kollagenschicht ablösen da sie einer wässrigen Phase (Kulturmedium) zugewandt ist. Werden die Zellen auf mikroporösen Membranen kultiviert, die gegebenenfalls die untere Matrixschicht 2 ersetzen kann und damit ein Teil des Sandwiches bildet, so kann ein Ablösen der Hepatozyten 1 auch von der Unterseite her erfolgen. Dies kann sowohl in Fällen auftreten in denen die Zellen direkt an der mikroporösen Struktur adhärieren oder wenn diese Membran mit einer Matrix vorbeschichtet wird.

-7-

Die Kultivierung der Hepatozyten kann entweder in einer Standardkultur in einem Kunststoff- oder Glasschälchen erfolgen, wobei die Sauerstoffzufuhr über das Kulturmedium 3 erfolgt oder in größerem Maßstab nach Art eines Bioreaktors, wobei schichtweise die Matrix 2 im Sandwichverfahren jeweils auf einer gasdurchlässigen Membrane angeordnet ist. Ein derartiger "Bioreaktor" ist in der DE 42 06 585 beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein rationelles Verfahren zu schaffen, bei dem der für Hepatozyten in der Sandwichtechnik bzw. Gel Entrapment Technik typische Funktionserhalt, trotz völligen Verzichtes auf die Zugabe von Serum oder anderen Zusätzen zu Standardkulturmedien möglich bleibt. Darüber hinaus soll ein mechanisch und biochemisch stabiles Kulturmodell mit höherer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erstellt werden.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die im kennzeichnenden Teil von Anspruch 1 genannten Merkmale gelöst.

Das erfindungsgemäße Vorgehen stellt somit eine Vereinfachung durch Limitierung auf die wesentlichen Komponenten dar.

Erfindungsgemäß kann eine Kombination von Fibronektin oder anderen Matrixkomponenten wie Kollagene (z.B. Typ III oder TypIV), Laminine, Vitronectin, Glycoproteine, Proteoglycane, Heparansulfat, Lipide, Linolensäure oder Lipopolysacharide zu der für die Sandwichtechnik bzw. Gel Entrapment Technik verwendeten Grundmatrix oder einem als Katalysator verwendeten Puffer (Mediumkonzentrat) durch-

-8-

geführt werden.

Die extrazellulären Matrixkomponenten erzeugen einen besseren "in vivo-Effekt", denn sie haben induktive Faktoren für die Hepatozyten (Leberzellen).

Praktisch geht man von einer einfachen Grundmatrix aus und fügt dann bausteinartig einen Stoff nach dem anderen hinzu. In vielen Fällen wird dabei die Zugabe von Fibronectin ausreichend sein.

Die Grundmatrix, die hauptsächlich bzw. im wesentlichen aus Kollagen Typ 1 besteht, kann aus Rattenschwanzkollagen, Haut oder Knorpelgewebe präpariert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat weitreichende Vorteile, so wurde in eigenen Vorarbeiten Fibronectin als einer noch fehlenden Faktoren identifiziert, der bei der Sandwichtechnik oder Gel Entrapment Technik die völlig serumfreie Kultur insbesondere auch hinsichtlich eines langfristigen Funktionserhalts ermöglicht. Wird Fibronectin vorzugsweise direkt der für die Sandwichtechnik oder Gel Entrapment Technik verwendeten Matrix zugemischt, so befinden sich diese Moleküle direkt innerhalb des Adhäsionssubstrats auf beiden Seiten der Zellen d.h. der Hepatozyten in Kontakt mit den sinusoidalen Seiten der Zellen. Durch den bei der Gelierung einsetzenden Vernetzungsprozess der Kollagenfibrillen werden die Fibronectinmoleküle innerhalb der Kollagenfibrillen zurückgehalten. Wird Fibronectin nur dem Überstand zugesetzt, so kann es indirekt in den stationären Matrixbereich diffundieren, wird jedoch zwangsweise bei den routinemäßig anfallenden Medienwechseln zu einem wesentlichen Teil wieder entfernt. Dennoch ist auch diese Methode schon bei einmaliger Gabe und entsprechend höherer Konzentration

-9-

von Fibronectin ausreichend, um eine stabile, serumfreie Kultur von Hepatozyten bei Verwendung der Technik der bipolaren Adhäsion an extrazellulärer Matrix zu ermöglichen. Die Sandwichtechnik ist hierfür besser geeignet als die Gel Entrapment Technik, da das fibronectinhaltige Suspensionsmedium mit den Zellen aufgegeben werden kann, bevor die zweite Matrixschicht aufgetragen wird. Die Verwendung konventioneller Kulturmedien wie z.B. Williams E oder DMEM wird somit auch im Rahmen serumfreier Kulturen ermöglicht.

Eines der Vorteile der erfindungsgemäßen Form des Verfahrens besteht somit in der stabilen Ausprägung der Grundlagen der längerfristigen serumfreien Kultur.

Dies führt zu einer Einsparung von Kosten, da das an sich teure Fibronectin innerhalb der bipolaren Matrix gebunden ist und nur einmal eingesetzt wird. Zweitens können in einem weiteren Vorteil der erfindungsgemäßen Form des Verfahrens nachfolgende Arbeiten mit beliebigen Medien durchgeführt werden. Für verschiedene Untersuchungen wurden spezielle Medien entwickelt, die hinsichtlich des zu erreichenden Ziels speziell adaptiert waren. Als Beispiel sei genannt, daß glucosefreie Medien zur Untersuchung der Gluconeogenese von Hepatozyten verwendet wurden. Sollen diese Untersuchungen nun auch in serumfreien Systemen durchgeführt werden, so müßte auf hierfür speziell definierte Medien wieder verzichtet werden und auf die sogenannten serumfreien Medien zurückgegriffen werden. Diese sind jedoch verständlicherweise nicht für derartige Spezialuntersuchungen konzipiert, sondern möglichst umfassend aufgebaut worden. Durch Ermöglichung der serumfreien Kultur allein durch die erfindungsgemäße Zusammensetzung des Adhäsionssubstrats im Rahmen der Sandwichtechnik oder Gel Entrapment Technik erhält der Untersucher eine besse-

-10-

re Flexibilität für seine Untersuchungen bei wesentlich überschaubareren und vereinfachten Kulturbedingungen. Die adhäsionsfördernde Wirkung von Fibronectin ist an sich bekannt. Die konventionelle Verwendung von Fibronectin ist im Zusammenhang mit Hepatozyten jedoch von keinem oder bestenfalls nur von kurzfristigen Vorteil.

Hepatozyten verlieren auf Einzelgel Unterlagen unabhängig von der Zusammensetzung des Kulturmediums (mit und ohne Serum) oder der Matrix (mit oder ohne Fibronectin) innerhalb weniger Tage ihre normale Morphologie und Funktionsfähigkeit. Die Verwendung des Begriffes serumfrei bedeutet in diesem Falle eher das Fehlen von FCS als die Ermöglichung von Grundlagen für die längerfristige serumfreie Kultur.

Die folgende Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der Verwendung von FCS (fetal calf serum) und Fibronectin bei der Hepatozytenkultur hinsichtlich des Einflusses auf die Kulturdauer zusammen. Das an sich bekannte Sandwichkultursystem eignet sich bei der Verwendung von FCS Zusatz, der zumindest auf die Adhäsionsphase begrenzt sein muß, sowohl für kurzfristige (einige Tage) als auch eine längerfristige Kultur (Wochen).

Nur die Verbindung von Fibronectin und einer komplett serumfreien Sandwichtechnik führt zu einem auch längerfristig stabilen und reproduzierbaren Kultursystem. Ein derartiges Modell ist der bisher bekannten Sandwichtechnik überlegen, da ein wesentlich verlässlicheres Kulturmodell erstellt werden kann.

Die durch die Veränderung der Matrixzusammensetzung unter Zusatz definierter Komponenten erzielbare Verbesserung ist jedoch nicht nur auf eine höhere Reproduzierbarkeit

-11-

beschränkt, wie z.B. das Studium von Wachstumshormonen. Durch die Kombination und Ermöglichung eines derartigen Ansatzes mit der Sandwichtechnik entsteht ein allen anderen Ansätzen (einschließlich der bisherigen Sandwichtechnik) überlegenes Modell. Die Expression von Cytochrom P450, einem sehr empfindlichen Parameter der Kulturqualität, fällt in konventionellen Ansätzen zur Sandwichtechnik trotz der Stabilisierung der Albuminsekretion besonders initial ab. Bei einer Veränderung der Matrixzusammensetzung in Sinne der Erfindung durch Zusatz von Fibronectin, resultiert eine Stabilisierung der P450 Expression auch im Vergleich mit frischen Lebergewebe auf einem Level von 100 % selbst in längerfristigen Untersuchungen.

Tabelle 1:

	Kurzzeitfähigkeit	Langzeitfähigkeit
Sandwich + FCS	(+ +)	(+ +)
Sandwich - FCS	(+ +)	-
Sandwich + FN	++	++
Einzelgel + FCS	(+)	-
Einzelgel - FCS	+	-
Einzelgel + FN	+	-

() wegen mangelnder Reproduzierbarkeit von z.B. Untersuchung von Rezeptorvermittelten Prozessen wie z.B. Wachstumsfaktoren.

Die Erfindung besteht also in der Verknüpfung mehrerer zum Teil bekannter Vorgehensweisen oder Substanzen (Sandwichtechnik/Gel Entrapment Technik/Fibronectin) und in einer speziellen Adaptation dieser Techniken für die primäre Hepatozytenkultur zu einem sinnvollen und bisher nicht bekannten Ganzen.

Erfindungsgemäß kann Fibronectin zu den nach der Sandwichtechnik/Gel Entrapment Technik kultivierten Hepatozyten auch zum Überstand hinzugegeben werden. Hierfür ist eine Einwirkzeit von einigen Stunden (nicht mehr als ca. 4 Std.) ausreichend, um auch dadurch eine stabile serumfreie Kultur mit ansonsten konventionellen Kulturmedien erreichen zu können (z.B. Williams E). Im Unterschied zur Zugabe von Fibronectin zur stationären Phase wie oben beschrieben ist dieses Verfahren für den Anwender/Verbraucher jedoch aufwendiger, da ein Medium mit Fibronectin für die Adhäsionsphase vorbereitet werden muß. Der ansonsten aus 2 Komponenten bestehende Kulturkit (Kollagen, Katalysatorkonzentrat, wobei eines von beiden die Matrixzusätze enthält) wird dadurch um eine dritte Komponente erweitert.

Im Unterschied zu bisherigen Verfahren die eine Veränderung/Induktion hepatozellulärer Funktionen allein durch den Informationsgehalt dieser Kofaktoren in Einzelgelsystemen zu erreichen versuchten, bildet die Basis des erfindungsgemäßen Verfahrens die Erkenntnis, daß die Position dieser Kofaktoren relativ zu den Hepatozyten einen weiteren wesentlichen Informationsgehalt für die Hepatozyten beinhaltet. Durch die Verwendung einer definierten und einfachen Grundmatix (z.B. Kollagen Typ I) für die Sandwichtechnik/Gel Entrapment Technik lassen sich somit stationäre Doppematrixsysteme unterschiedlicher Komplexität systematisch aufbauen.

Erfindungsgemäß werden zusätzlich die für die Sandwichtechnik notwendigen Materialien in einem gebrauchsfertigen Kit zusammengesetzt. Dies bezieht sich auf die Anwendung dieser Erkenntnisse zur Herstellung eines entsprechend konfigurierten Hepatozytenkulturkits. Dieser besteht aus einer Kollagenlösung, einem Mediumkonzentrat eines

-13-

Standardkulturmediums, die separat in zwei sterilen Behältern bei ca. 4 °C aufbewahrt werden können. Fibronektin kann entweder der Matrix oder dem Katalysatorpuffer zugesetzt werden. Alle Reagenzien können auch in Pulverform vorbereitet werden.

Erfindungsgemäß kann auch eine serumfreie Kokultur zwischen bipolar adhärenzten Hepatozyten mit Zellen, die oberhalb der, die Hepatozyten bedeckenden, Matrixschicht kultiviert werden, vorgenommen werden. Dies dient der Durchführung des Studiums von Interaktionen in serumfreien Medien zwischen diesen Zellarten. Hierzu zählen toxikologische Untersuchungen und Mutagenitätsteste.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt in der Verwendbarkeit von Hepatozyten verschiedener Spezies wie auch z.B. humaner Hepatozyten, da die Matrixzusammensetzung in Abhängigkeit von der verwendeten Spezies adaptiert werden kann, um eine bessere Kulturstabilität zu erreichen.

Nachfolgend sind 4 Ausführungsbeispiele des erfindungsgemäßen Verfahrens prinzipmäßig erläutert.

Es zeigt:

Fig. 1 eine bevorzugte Form bei direkter Zugabe von Matrixkomponenten zu einer Grundmatrix oder einem Katalysatorgemisch und Kombination mit der Sandwichtechnik;

Fig. 2a eine Situation während der Vorbereitung der Sandwichtechnik und Zugabe von Fibronektinmolekülen in das Medium;

Fig. 2b die Sandwichtechnik nach Fig. 2a mit einer zwei-

-14-

ten, oberen Matrixschicht als stationäre Phase;

Fig. 3 eine Form bei direkter Zugabe der Matrixkomponenten zur Grundmatrix oder dem Katalysatorgemisch und Kombination der Gel Entrapment Technik;

Fig. 4 eine Situation bei Verwendung der Gel Entrapment Technik und Zugabe von Fibronectinmolekülen (F) in das Medium nach erfolgter Verfestigung der Grundmatrix.

Gemäß Fig. 1 befinden sich Hepatozyten 1 innerhalb einer stationären Phase mit bipolarer (zweiseitiger, oben und unten) Adhäsion an einer extrazellulären Matrix 2. Einer Grundmatrix zugesetzte Matrixmoleküle F sind innerhalb dieser Matrix gebunden. Als Matrixmoleküle können z.B. Fibronectinmoleküle 4 vorgesehen sein. Dies bedingt eine Anreicherung der Fibronectinmoleküle innerhalb der die Hepatozyten 1 umgebenden fibrillären Matrix 2. Über der gebundenen Matrixkomponente, z.B. Fibronectinmoleküle 4, die in die stationäre Phase der Matrix 2 eingebettet ist, befindet sich ein Kulturmedium 3.

Gemäß Fig. 2a können Fibronectinmoleküle 4 zumindest während der Adhäsionsphase direkt auf die Hepatozyten 1 einwirken, werden danach aber zum Zeitpunkt der Überschichtung mit der zweiten Matrixschicht entfernt, soweit sie nicht in die Matrix 2 diffundieren (siehe Fig. 2b). Oberhalb des Sandwiches befindet sich das Kulturmedium 3.

Wie in Fig. 3 dargestellt, befinden sich Hepatozyten 1 innerhalb der stationären Phase 2 mit bipolarer (zweiseitiger, oben und unten) Adhäsion an die extrazelluläre Matrix 2. Der Grundmatrix zugesetzte Matrixmoleküle (F)

-15-

sind innerhalb dieser Matrix gebunden. Dies bedingt eine Anreicherung z.B. von Fibronectinmolekülen 4 innerhalb der die Hepatozyten 1 umgebenden fibrillären Matrix 2.

Wie aus Fig. 4 ersichtlich ist, erreichen Fibronectinmoleküle 4 indirekt die Hepatozyten 1, werden danach aber zum Zeitpunkt nachfolgender Medienwechsel wieder entfernt, soweit sie nicht in die Matrix 2 diffundieren. Fibronectinmoleküle 4 befinden sich auch in dem darüberliegenden Kulturmedium 3.

Anstelle oder zusätzlich zu den in den Ausführungsbeispielen dargestellten Fibronectinmolekülen 4 können auch andere bzw. weitere extrazelluläre Matrixkomponenten der vorstehend beschriebenen Art in die Kollagen- bzw. Matrixschicht 2 eingebracht werden.

Erfindungsgemäß können zur Kollagenmatrix weitere mechanisch stabilisierende Faktoren wie Ca-alginat, Fibrinogen, k-carrageenan, Agar, Agarose, Harze, Gelatine und gelbildende Substanzen, wie z.B. Carbopol (Polyakrylsäure), eventuell auch photopolymerisierende Harze und Polyurethan hinzugegeben werden. Weiterhin ist die Hinzumischung von Klebstoffen auf der Basis von Knochenleim, Hassenleim oder anderen biologischen aber auch nicht biologischen Ursprungsmaterialien möglich, sofern diese nicht toxisch sind.

Wichtig hierbei ist nur, daß eine Polymerisation bzw. Verfestigung der bedeckenden Matrixschicht erst nach Ausbildung eines Hepatozytenmonolayers erfolgt (Sandwichteknik/Gel Entrapment Technik). Dadurch sollen bei der Gel Entrapment Technik die Hepatozyten als Monolayer innerhalb von 2 Schichten eingebettet werden. Die Vorrichtung ist somit durch eine strikte Trennung der Hepatozy-

-16-

ten- und Matrixschichtung gekennzeichnet entsprechend dem Prinzip der Sandwichtechnik und der modifizierten Gel Entrapment Technik bei der die Hepatozyten innerhalb der Matrix in einem Arbeitsgang aufgegeben werden und dann innerhalb der Matrix eine Sedimentation der Hepatozyten als Monolayer erfolgen kann, bevor eine Polymerisation der Matrix eintritt. Dies ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal im Unterschied zu anderen Verfahren der Zellinkapsulation, die immer nur Zellen als Aggregate, Spheroide oder als isolierte Zellen inkapsulierten.

In einer weiteren vorteilhaften Form der Erfindung kann die zur Adhäsion benötigte Matrix auch stabil, z.B. durch kovalente Bindungen oder durch vorhergehende Ionisation der Zellkulturmaterialien (Membranen wie Polypropylen, Polyester, oder anderweitige Unterlagen wie z.B. Polystyren, Vicryl., Polykarbonate oder sonstige Kunststoffe, Glas) gebunden werden. Hierbei wäre eine Mischung aus Kollagen und Fibronectin besonders vorteilhaft. Es können so sehr stabile (Monate bis Jahre) Verbindungen zwischen anorganischen Trägerflächen und organischen Molekülen zur Vorbereitung einer Sandwichtechnik/Gel Entrapment Technik bereitgestellt werden. Zur Überschichtung kann dann wieder ein Kollagen-Fibronectin - Gemisch mit und ohne Ca-Alginaten oder auch nur z.B. Ca-Alginat aufgegeben werden.

Im Gegensatz zu den bekannten und für Hepatozyten ineffizienten Techniken zur Verbesserung der Matrixbedingungen und Kulturbedingungen liegt erfindungsgemäß ein Verfahren vor, das durch Kombination der Technik der bipolaren Adhäsion von Hepatozyten an eine einfache Grundmatrix und der Zumischung von weiteren definierten Faktoren wesentliche Vorteile für die längerfristige Kultur dieser Zellen ermöglicht. Hierzu zählt z.B. die Ermöglichung einer

-17-

völlig serumfreien Kultur von Leberzellen bei erhöhter mechanischer und biochemischer Stabilität des Kultursystems.

Es liegt nunmehr erfindungsgemäß ein einfach anzuwendendes Verfahren vor, das bei vollem Funktionserhalt in vitro die Verwendung von Standard-Kulturmedien für die serumfreie Kultur dieser Zellen ermöglicht und zur Herstellung eines entsprechend konfigurierten Zellkulturkits zur serumfreien Kultur mit konventionellen Medien geeignet ist.

P a t e n t a n s p r ü c h e

=====

1. Verfahren zum Züchten von bipolar adhärenzierten Hepatozyten (1), insbesondere im Sachwichverfahren, wobei die Hepatozyten (1) in Kontakt der beiden sinusoidalen Seiten mit polarisiert zu den Hepatozyten angebrachter Matrix (2) liegen,
g e k e n n z e i c h n e t durch
die Verwendung von definierten Zusätzen extrazellulärer Matrixkomponenten (F) zu einer Grundmatrix, wodurch eine polarisierte Anreicherung und Bindung dieser Faktoren im stationären Matrixkontaktbereich der Hepatozyten (1) erreicht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
als Grundmatrix, hauptsächlich Kollagen, z.B. Typ I, verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
als extrazelluläre Matrixkomponenten (F), Fibronectin (4), Kollagene (z.B. Typ III oder Typ IV), Laminine, Vitronectin, Glycoproteine, Proteoglycane, Heparansulfat, Lipide, Linolensäure, Lipopolysacharide oder Mischungen daraus verwendet werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
mechanisch stabilisierende Komponenten verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß

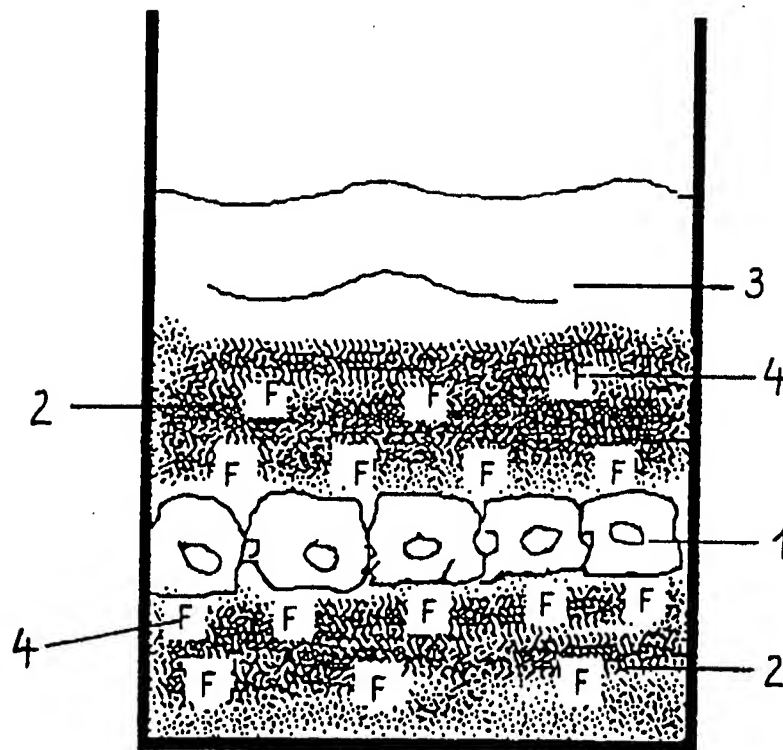
als mechanisch stabilisierende Komponenten Ca-Alginate, Fibrinogen, k-carrageenan, Agar, Agarose, Harze, Polyurethan, Gelatine und gelbildende Substanzen, wie z.B. Carbopol (Polyakrylsäure), Knochenleim oder Hasenleim verwendet werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
g e k e n n z e i c h n e t durch
die Verwendung extrazellulärer Matrixkomponenten als definierter indirekter Zusatz zur Matrix bei Zugabe mit dem Kulturmedium (3) während der Adhäsionsphase und gleichzeitiger oder nachfolgender Kultivierung der Hepatozyten in Kontakt der beiden sinusoidalen Seiten mit extrazellulärer Matrix (2), ermöglicht entweder durch die sogenannte Sandwichtechnik oder alternativ durch die Gel Entrapment Technik.
7. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
extrazelluläre Matrixkomponenten (F) und/oder mechanisch stabilisierende Komponenten einem Katalysatorgemisch zugemischt werden, das aus einem Konzentrat, z.B. einem Nährmediumkonzentrat oder einer Pufferlösung, besteht.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
die für die Kultur bipolar adhärierter Hepatozyten (1) notwendigen Reagenzien und Protokolle bei Verwendung der durch diese Zusätze verbesserten Grundmatrix (2) in einem Kit zusammengestellt werden, bestehend aus einer Grundmatrix (2) und einem Katalysatorgemisch, wobei entweder eines oder beide dieser Substanzen extrazellulärer Matrixkomponenten nach Anspruch 3 und/oder stabilisierende Komponenten nach

Anspruch 4 oder 5 enthalten.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
die für die Kultur bipolar adhärierter Hepatozyten
(1) notwendigen Reagenzien und Protokolle bei Verwen-
dung der durch die extrazellulären Matrixkomponenten
verbesserbaren Grundmatrix (2) in einem Kit zusammen-
gestellt werden, bestehend aus einer Grundmatrix (2)
und einem Katalysatorgemisch, wobei keines dieser
Substanzen die Zusätze enthalten und diese dann se-
parat als drei Komponente des Kits angeboten werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
die für den Kit zusammenzustellenden Basisreagenzien
aus Rattenschwanzkollagen, Knorpelgewebe oder Haut-
kollagen hergestellt werden und daß das Katalysator-
gemisch ein 10 fach Konzentrat eines beliebigen oder
sonst nicht für die serumfreie Kultur von Hepatozyten
geeigneten Mediums darstellt.
11. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
die serumfreie Kokultur von bipolar adhärierten Hepa-
tozyten (1) entweder entsprechend der Sandwichtechnik
oder der Gel Entrapment Technik und einer weiteren
Zellart mit Zellkulturen unter Zusatz von Fibronectin
(4) durchgeführt wird.

1 / 3

Fig.1

2/3

Fig.2a

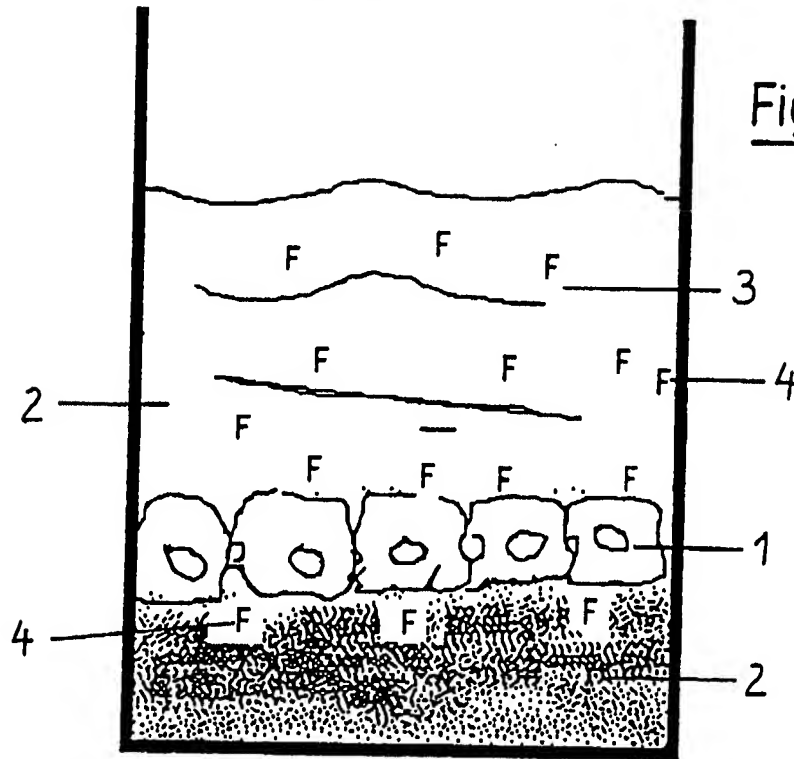
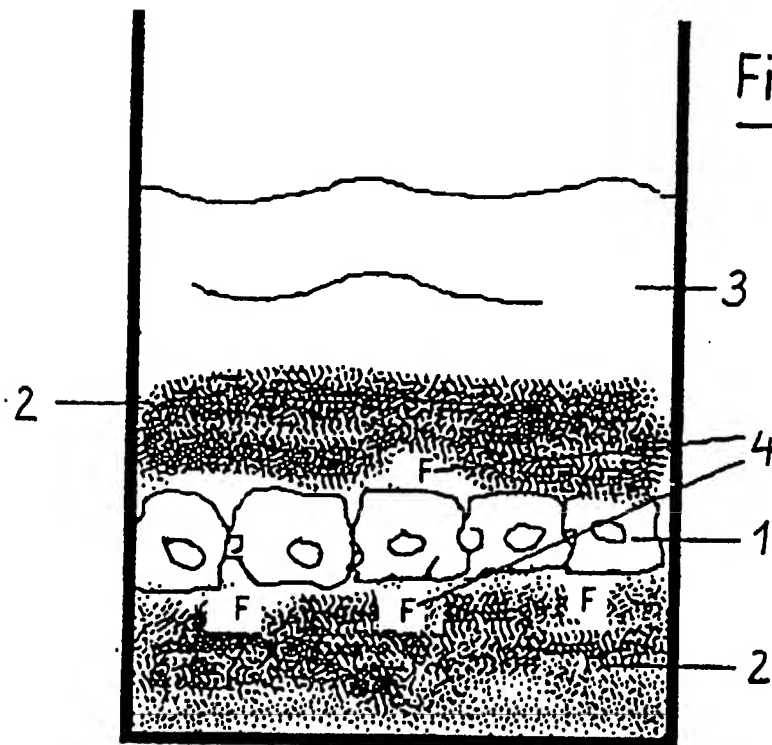
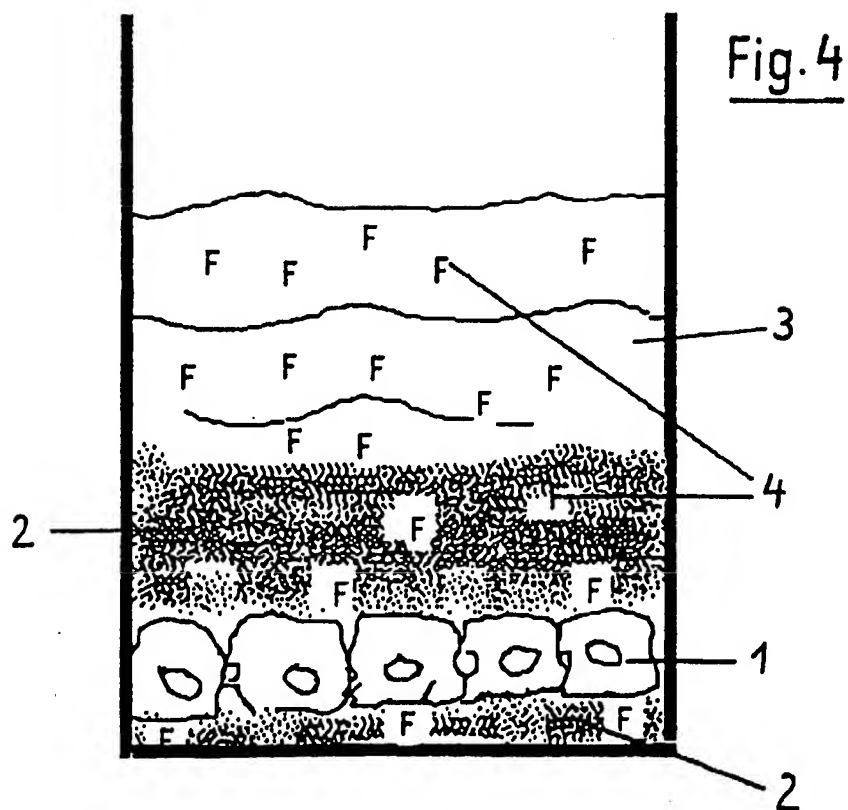
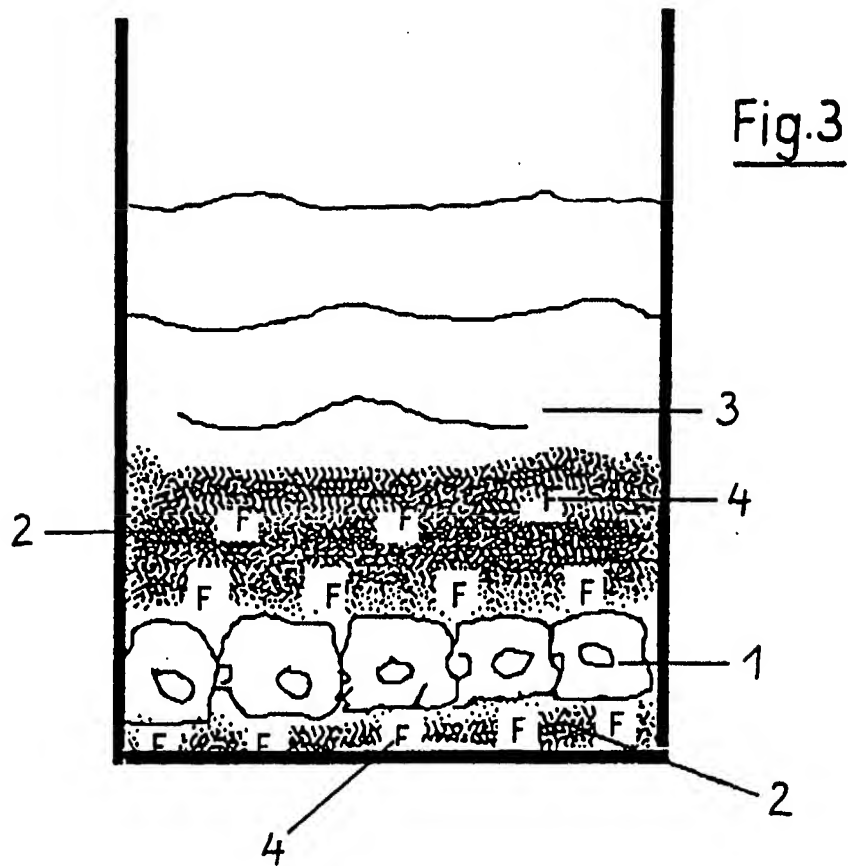


Fig.2b



3/3



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N5/06 C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FASEB JOURNAL, vol.3, no.2, February 1989, BETHESDA, MD US pages 174 - 177 J.C.Y. DUNN ET AL. 'HEPATOCYTE FUNCTION AND EXTRACELLULAR MATRIX GEOMETRY: LONG-TERM CULTURE IN A SANDWICH CONFIGURATION' see the whole document --- -/--</p>	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 January 1995

Date of mailing of the international search report

06 -02- 1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rykebosch, A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.213, no.2, April 1993, BERLIN, DE pages 805 - 814 B. SAAD ET AL. 'CRUDE LIVER MEMBRANE FRACTIONS AND EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS AS SUBSTRATA REGULATE DIFFERENTIALLY THE PRESERVATION AND INDUCIBILITY OF CYTOCHROME P-450 ISOENZYMES IN CULTURED RAT HEPATOCYTES.' see page 806, right column, line 12 - line 58; table 1</p> <p>---</p>	1-3,6-11
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 5, 1 February 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 34404y, N. SAWADA ET AL. 'EFFECTS OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS ON THE GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CULTURED RAT HEPATOCYTES.' page 320 ; see abstract & IN VITRO CELL. DEV. BIOL., vol.23, no.4, 1987 pages 267 - 273</p> <p>---</p>	1-3,6-11
Y	<p>EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol.208, no.2, October 1993, NEW YORK, N.Y., US pages 442 - 452 R.M. EZZELL ET AL. 'EFFECT OF COLLAGEN GEL CONFIGURATION ON THE CYTOSKELETON IN CULTURED RAT HEPATOCYTES.' see page 444, right column - page 445, left column, line 12 see page 451, right column, paragraph 3</p> <p>---</p>	4,5
A	<p>JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol.16, no.SP.1, 1992, AMSTERDAM, NL page S78 A. BADER ET AL. 'THE SANDWICH CULTURE TECHNIQUE FOR PRIMARY HEPATOCYTES - TOMORROW'S GOLDEN STANDARD?' see abstract T-19</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>WO,A,93 18133 (A. BADER) 16 September 1993 cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-11
P,X	<p>WO,A,94 01535 (A. BADER) 20 January 1994 see page 8, line 8 - line 15; claims see page 9, line 8 - line 10</p> <p>-----</p>	1-3

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9318133	16-09-93	DE-A-	4206585	09-09-93
		CA-A-	2129648	16-09-93
		EP-A-	0629237	21-12-94
		NO-A-	943242	01-09-94

WO-A-9401535	20-01-94	DE-A-	4222345	13-01-94
		AU-B-	4565193	31-01-94

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N5/06 C12N5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>FASEB JOURNAL, Bd.3, Nr.2, Februar 1989, BETHESDA, MD US Seiten 174 - 177 J.C.Y. DUNN ET AL. 'HEPATOCYTE FUNCTION AND EXTRACELLULAR MATRIX GEOMETRY: LONG-TERM CULTURE IN A SANDWICH CONFIGURATION' siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Januar 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06 -02- 1995

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd.213, Nr.2, April 1993, BERLIN, DE Seiten 805 - 814 B. SAAD ET AL. 'CRUDE LIVER MEMBRANE FRACTIONS AND EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS AS SUBSTRATA REGULATE DIFFERENTIALLY THE PRESERVATION AND INDUCIBILITY OF CYTOCHROME P-450 ISOENZYMES IN CULTURED RAT HEPATOCYTES.' siehe Seite 806, rechte Spalte, Zeile 12 - Zeile 58; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,6-11
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 5, 1. Februar 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 34404y, N. SAWADA ET AL. 'EFFECTS OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS ON THE GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CULTURED RAT HEPATOCYTES.' Seite 320 ; siehe Zusammenfassung & IN VITRO CELL. DEV. BIOL., Bd.23, Nr.4, 1987 Seiten 267 - 273</p> <p>---</p>	1-3,6-11
Y	<p>EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, Bd.208, Nr.2, Oktober 1993, NEW YORK, N.Y., US Seiten 442 - 452 R.M. EZZELL ET AL. 'EFFECT OF COLLAGEN GEL CONFIGURATION ON THE CYTOSKELETON IN CULTURED RAT HEPATOCYTES.' siehe Seite 444, rechte Spalte - Seite 445, linke Spalte, Zeile 12 siehe Seite 451, rechte Spalte, Absatz 3</p> <p>---</p>	4,5
A	<p>JOURNAL OF HEPATOLOGY, Bd.16, Nr.SP.1, 1992, AMSTERDAM, NL Seite S78 A. BADER ET AL. 'THE SANDWICH CULTURE TECHNIQUE FOR PRIMARY HEPATOCYTES - TOMORROW'S GOLDEN STANDARD?' siehe Zusammenfassung T-19</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>WO,A,93 18133 (A. BADER) 16. September 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-11
P,X	<p>WO,A,94 01535 (A. BADER) 20. Januar 1994 siehe Seite 8, Zeile 8 - Zeile 15; Ansprüche siehe Seite 9, Zeile 8 - Zeile 10</p> <p>-----</p>	1-3

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9318133	16-09-93	DE-A- 4206585	09-09-93
		CA-A- 2129648	16-09-93
		EP-A- 0629237	21-12-94
		NO-A- 943242	01-09-94

WO-A-9401535	20-01-94	DE-A- 4222345	13-01-94
		AU-B- 4565193	31-01-94
